

明 細 書

新規蛍光性微粒子

技術分野

本発明は、希土類蛍光錯体を含有してなるシリカ粒子、より詳細には希土類蛍光錯体を実質的にシリカ粒子の内部層に選択的に含有してなる希土類蛍光錯体含有シリカ粒子、さらに詳細には希土類蛍光錯体をシリカ粒子の内部層に選択的に含有し、かつ表面が実質的にシリカからなる希土類蛍光錯体含有シリカ粒子、該シリカ粒子を含んでなる蛍光標識剤および該シリカ粒子を標識剤として用いる蛍光標識方法、並びに、該蛍光標識剤を用いた蛍光測定法及び蛍光測定法用試薬に関する。

背景技術

従来から、生体試料中の微量分析の分析法として、抗原－抗体反応を利用したイムノアッセイや、DNAハイブリダイゼーションなどがよく利用されている。これらの分析方法においては、抗体、DNAなどを標識する標識剤を使う必要があり、高感度検出を可能にする標識剤として、蛍光による標識、放射性同位体による標識、酵素による標識等がよく用いられている。

放射性同位体による標識は高感度ではあるが、貯蔵、使用、処理に際して危険を伴う欠点がある。また、酵素による標識は、酵素の分子量が大きく、温度などの外的要因による影響を受けやすく不安定であり、再現性に劣るという問題点や、酵素標識剤を被標識物に結合させることにより、酵素および被標識物の活性が低下してしまうという欠点がある。

また、蛍光による標識法としては、有機蛍光色素による標識（例えば、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロライドなど）が知られているが、励起光の散乱によるバックグラウンドノイズやサンプル中に存在する他の共存物質の蛍光に由来するバックグラウンドノイズにより標識剤からの蛍光検出が大きく阻害され、高感度の測定が困難になるという欠点がある。

蛍光による標識方法としては、この他に、希土類蛍光錯体による標識が知られて

いる。希土類蛍光錯体は、長い蛍光寿命（通常の有機の蛍光物質が持つ数ナノ秒の蛍光寿命に比べ、希土類蛍光錯体は数十から数百マイクロ秒以上の蛍光寿命を持つ）、大きなストークスシフト、シャープな蛍光発光ピークという特性を有している。この特性を生かし時間分解測定を用いて、励起光や共存物質に由来する短寿命のバックグラウンドノイズを除去することで高感度測定が可能になる。かかる特性により、希土類蛍光錯体を標識剤とした時間分解測定法が既に開発されている。

本発明者らはすでに多くの希土類蛍光錯体標識剤を開発し、それらを用いた時間分解測定法への応用を検討してきた。しかし、被標識物との結合基を有する錯体の合成は反応ステップが多くなり、困難を伴い、合成された錯体は結合基の性質によって大きく変化する場合もある。また、錯体のキレート力が十分でない場合には、使用できる緩衝液の種類に制限があるという欠点がある。さらに、被標識物の結合部位が少ない場合には被標識物の分子当たりの希土類蛍光錯体標識剤の分子数は制限され、感度の向上には限界がある。

一方、DNAの分析においては、DNAプローブ法がよく用いられている。この方法は2種あるいはそれ以上の標識剤を用いて標準試料と検体とを標識し、これらを同一プローブDNAに与え、競合的ハイブリダイゼーションの結果によって検体中のDNA量を定量している。しかしこの方法では、検体に対し標識剤を導入する必要があり、この操作の結果として検体中のターゲット配列の存在比が変化する可能性が生じる。また、標識剤の導入によってDNAの二本鎖形成能が低下し、遺伝子の変異や多型の診断に間違った結果を与えるおそれがある。

また、蛍光発光体はプラズマディスプレイパネル（PDP）などの3原色の発光体として、希土類金属だけでなく、カルシウム、亜鉛、マンガンなどの金属イオンが使用されている。これらの発光体はパネル用のものであるから、蛍光発光強度だけでなく機械的な強度や持続性が必要とされるためにいろいろな工夫がなされている。例えば、粒子径が $5 \sim 20 \mu\text{m}$ で比表面積が $100 \sim 800 \text{ m}^2/\text{g}$ のシリカ粒子の表面をこれらの蛍光性の金属イオンによるケイ酸塩として使用する蛍光発光体（特許文献1参照）、酸化亜鉛微粒子をシリカ粒子に内包させた蛍光発光体（特許文献2参照）、比表面積が $100 \text{ m}^2/\text{g}$ 以下で、アルコキシシランを加水分解してなるシリカ粒子に有機カルボン酸を含有させてなる蛍光発光体（特許文献3参

照)、シリカなどの無機物質の表面に蛍光体を担持されたもの(特許文献4参照)、
発光体粒子の表面を屈折率が1.435以上のシリカ膜で被覆したもの(特許文献
5及び6参照)、シリカの3次元構造の少なくとも一部を有機物質で置換した有機
-無機複合型マトリックス構造に、EuやTbなどの希土類錯体をゾルーゲル法に
より導入してなる蛍光体(特許文献7参照)などが報告されている。

また、シリカ粒子自体は、DNAやタンパク質などの担体としても広く利用され
ており、例えば、シリカなどの無機微粒子の表面を架橋された樹脂で被覆し、これ
にDNAなどを固定化する方法(特許文献8参照)などがある。さらに、標識用の
錯体の配位子をシリカなどの個体支持体の表面に固定化し、これに金属類を結合さ
せる方法(特許文献9参照)などが報告されている。

しかしながら、特許文献1～7に記載の蛍光体は、粒子全体に蛍光体が分布して
いるものであり、蛍光体の寿命や機械的強度などの改善を目的としたPDPなどの
蛍光体として利用されるものである。このような蛍光体は、蛍光体物質が粒子の表
面まで分布しており、緩衝液などの外部の環境の影響を受けやすく、また粒子表面
にDNAやタンパク質などを担持させるため反応性の官能基の存在が少ないので、
標識用の蛍光粒子としては適さないものであった。

本願の発明に関連する先行技術文献としては次のものがあり、これは参照して本
明細書中に取り込まれる。

1. 特開2003-213254号
2. 特開2003-201473号
3. 特開2003-155478号
4. 特開2002-180041号
5. 特開2002-69442号
6. 特開2001-55567号
7. 特開平09-227861号
8. 特開2001-183378号
9. 特表平09-505061号

発明の開示

本発明は、上記した如き現状に鑑みなされたもので、内部に多数の希土類蛍光錯体を含み、緩衝液、被標識物等の外部の環境の影響を受けないという特徴を有する新規なシリカ粒子と、該シリカ粒子を含んでなる蛍光標識剤および該シリカ粒子を標識剤として用いる蛍光標識方法、並びに、該蛍光標識剤を用いた蛍光測定法等を提供することを目的とする。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明のBPTA-Tb錯体を含むシリカ粒子の蛍光スペクトルを示す図である。分散液中のシリカ粒子の濃度＝0.1mg/ml、水中。励起波長＝320nm

第2図は、本発明のBPTA-Tb錯体を含むシリカ粒子（第2図の右側）、及びBPTA-Tb錯体の溶液の各種pH緩衝液中における蛍光強度に与える影響を調べた結果を示すものである。

第3図は、本発明のBTTEu錯体を含むシリカ粒子の蛍光スペクトルを示す図である。分散液中のシリカ粒子の濃度＝0.1mg/ml、水中。励起波長＝340nm

第4図は、本発明のシリカ粒子で標識化されたDNAの時間分解蛍光測定で得られた蛍光強度を示す図である。

第5図は、本発明のBTTEu錯体を含むシリカ粒子の走査型電子顕微鏡写真である。粒子は白金パラジウムを用いて被覆してある。

第6図は、本発明の表面修飾をしていないシリカ粒子で標識化されたDNAの時間分解蛍光測定で得られた蛍光強度を示す図である。

第7図は、本発明の表面に二価性インターカレーターを導入したシリカ粒子で標識化されたDNAの時間分解蛍光測定で得られた蛍光強度を示す図である。

第8図は、本発明の表面に一価性インターカレーターを導入したシリカ粒子で標識化されたDNAの時間分解蛍光測定で得られた蛍光強度を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは上記課題を解決すべく、鋭意研究を重ねた結果、シリカ粒子の内部に選択的に蛍光物質が存在し、蛍光物質が存在する内部構造の外側に実質的にシリカからなる表面層を有する構造からなる蛍光物質を内包するシリカ粒子を簡便な手法で得られることを見出した。

即ち、本発明は、希土類蛍光錯体を含有してなる希土類蛍光錯体含有シリカ粒子、より詳細には希土類蛍光錯体を実質的にシリカ粒子の内部層に選択的に含有してなる希土類蛍光錯体含有シリカ粒子、さらに詳細には、本発明は、希土類蛍光錯体を実質的にシリカ粒子の内部層に選択的に含有し、且つ表面が実質的にシリカからなる希土類蛍光錯体含有シリカ粒子に関する。また、本発明は、テトラアルコキシオルトシリケートを希土類蛍光錯体の存在下で、エマルジョン重合させてなる希土類蛍光錯体含有シリカ粒子の製造方法に関する。

さらに、本発明は、前記した本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子からなる蛍光標識剤、当該希土類蛍光錯体含有シリカ粒子の表面に核酸プローブが結合してなる蛍光標識化核酸プローブ、当該希土類蛍光錯体含有シリカ粒子に二本鎖DNAと特異的に結合するインターカレーターが導入されている希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を用いて、二本鎖DNAを検出する方法、及び前記した本発明の蛍光標識剤又は当該蛍光標識剤を含有してなるマーカー、及び標的分子測定用の資材を含んでなる標的分子測定用キットに関する。

本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子は、従来のゾルーゲル法などの方法によって製造される蛍光発光体のように、シリカ粒子の全体にほぼ均一に蛍光物質が配合されているシリカ粒子とは異なり、シリカ粒子の内部に多くの希土類蛍光錯体が選択的に取り込まれているものであり、粒子の表面付近は実質的にシリカがそのまま存在しているものである。このために、本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子は、内部の蛍光錯体が外部環境の影響を受けないこと、また、粒子の表面に標識される物質（被標識物）と結合できる活性置換を容易に導入することができること、さらに粒子の表面にインターカレーター分子を導入することで二本鎖DNAを直接標識可能なものである。

本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子は、実質的に希土類蛍光錯体を含有する内部層と、実質的にシリカからなり希土類蛍光錯体を実質的に含有していないシリ

力表面層の2層構造を有することを特徴とするものである。希土類蛍光錯体は、シリカ粒子の内部又は表面などの粒子中のいかなる場所に存在してもよいが、希土類蛍光錯体が蛍光錯体としての機能を発揮する部位がシリカ粒子の内部であることが好ましい。本発明においては希土類蛍光錯体が、シリカ粒子の内部層で蛍光錯体としての機能を発揮できる場合を、実質的に希土類蛍光錯体がシリカ粒子の内部層に存在するという。

本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子は、前記したような2層構造を形成できる各種の手法で製造することができ、例えば、テトラアルコキシオルトシリケートなどのシリカ材料を希土類蛍光錯体の存在下で、エマルジョン重合させる方法が簡便で、かつ効率的に目的の2層構造を形成させることができ、本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子の好ましい製造方法としてあげることができる。

例えば、水非混和性の有機溶媒及び水の混合系に、界面活性剤を加え、テトラアルコキシオルトシリケートなどのシリカ材料を加えて、超音波処理などにより乳化させる。このようにして得られる乳化液をI液とする。そして、II液として、触媒及び希土類蛍光錯体を含有する乳化液を同様に調製する。そして、I液とII液とを混合して、エマルジョン重合させて製造することができる。

I液における水非混和性の有機溶媒としては、界面活性剤の存在下で水と乳化液を形成できるものであればよいが、さらにテトラアルコキシオルトシリケートなどのシリカ材料の溶媒となるものが好ましい。I液における水非混和性の有機溶媒の例としては、シクロヘキサン、ヘキサン、オクタン、ヌジョールなどの炭化水素系溶媒、ヘキサノール、ヘプタノールなどの脂肪族アルコールなどの1種又は2種以上の混合物が挙げられる。乳化するための界面活性剤としては、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤のいずれでもよいが、トリトンX、ベリジュ(Brij.)などの非イオン性界面活性剤が好ましい。界面活性剤の使用量は乳化に必要な量であればよい。

I液は、水非混和性の有機溶媒及び界面活性剤の混合液に水を加えて、乳化し、これにテトラアルコキシオルトシリケートなどのシリカ材料を加えて調製される。使用されるシリカ材料としては、触媒の存在下にエマルジョン重合によりシリカ粒子を形成できるものであれば、特に制限はないが、テトラアルコキシオルトシリケ

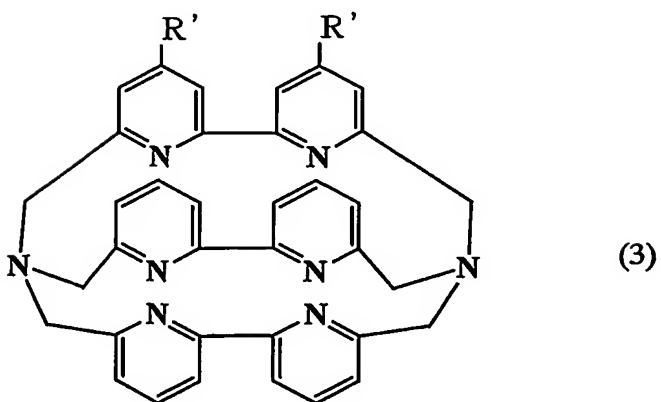
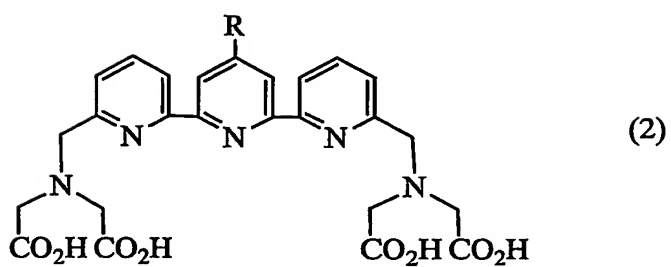
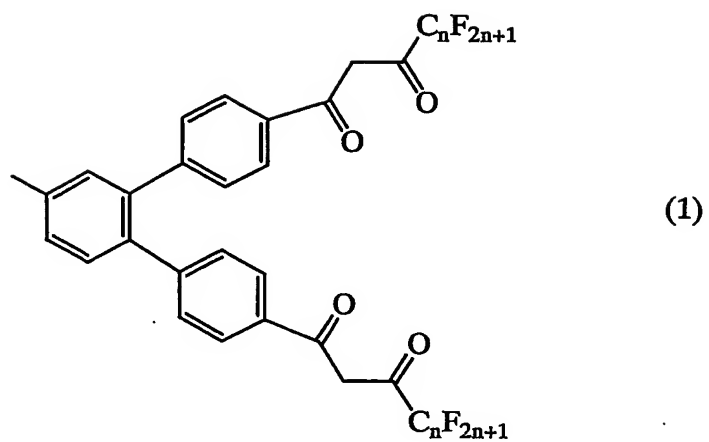
ートが好ましいシリカ材料として挙げられる。テトラアルコキシオルトシリケートのアルコキシ基としては炭素数 1～8、好ましくは炭素数 1～5 程度の分枝状又は直鎖状の低級アルコキシ基が好ましい。テトラアルコキシオルトシリケートにおける 4 個のアルコキシ基は同じであるのが好ましいが、必ずしも同じものである必要はない。好ましいアルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基などが挙げられ、具体的には、テトラエトキシオルトシリケート、テトラメトキシオルトシリケートなどが挙げられる。

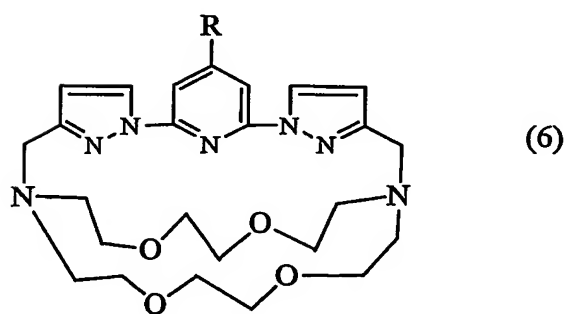
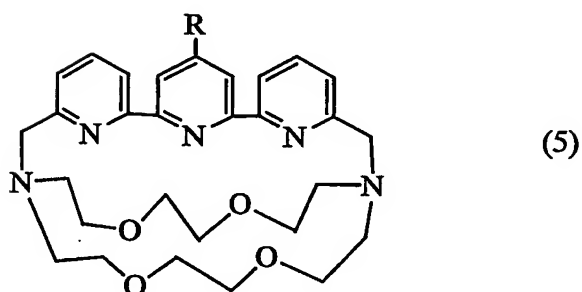
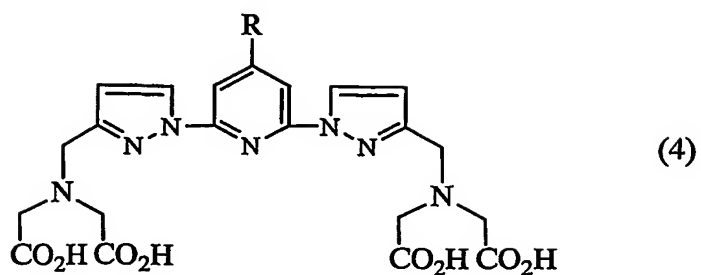
II 液は、希土類蛍光錯体と触媒を含有する乳化液であり、I 液と同様な組成の乳化液が好ましい。I 液と同様な方法により乳化液とすることができ、例えば、希土類蛍光錯体と触媒の水溶液と、前記 I 液で示した水非混和性の有機溶媒及び界面活性剤の混合液を混合し、これを攪拌や超音波処理などにより乳化するのが好ましい。この場合の水非混和性の有機溶媒や界面活性剤は、前記した I 液と同じものを使用するのが好ましい。

I 液と II 液の混合法は、I 液に II 液を徐々に添加する方法が好ましい。この方法によれば、シリカ材料の乳化液中に希土類蛍光錯体と触媒とが少量ずつ添加されることになり、希土類蛍光錯体の取り込みとオルトシリケートの重合が、大過剰のアルコキシオルトシリケートの中の界面で行われるために、本発明のシリカ粒子を簡便に、かつ小粒子径（ナノオーダー）で得ることができる。

ここで使用される触媒としては、酸又は塩基でシリカ材料を重合させることができるものであれば特に制限はないが、希土類蛍光錯体と安定に共存できるものが好ましい。このような触媒としては、具体的には、アンモニア、水酸化ナトリウムなどの無機塩基や、塩酸、硫酸などの無機酸が挙げられる。

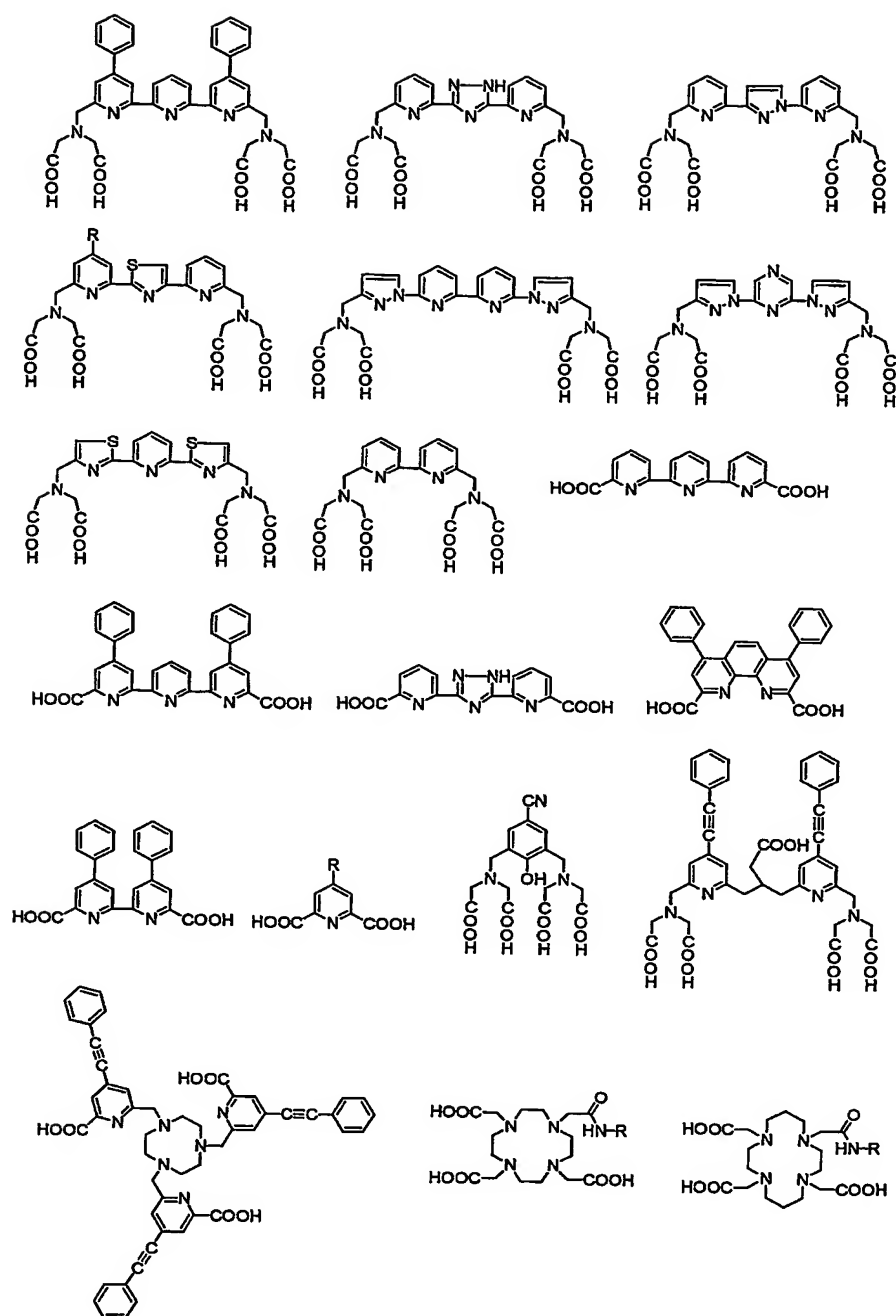
本発明の希土類蛍光錯体としては、希土類金属を中心元素として蛍光を発するものであれば特に制限はないが、長い蛍光寿命（通常の有機の蛍光物質が持つ数ナノ秒の蛍光寿命に比べ、希土類蛍光錯体は数十から数百マイクロ秒以上の蛍光寿命を持つ）、大きなストークスシフト、シャープな蛍光発光ピークという特性を有し、標識剤として時間分解測定法が利用できる希土類蛍光錯体が好ましい。好ましい希土類蛍光錯体としては、次の一般式（1）～（6）



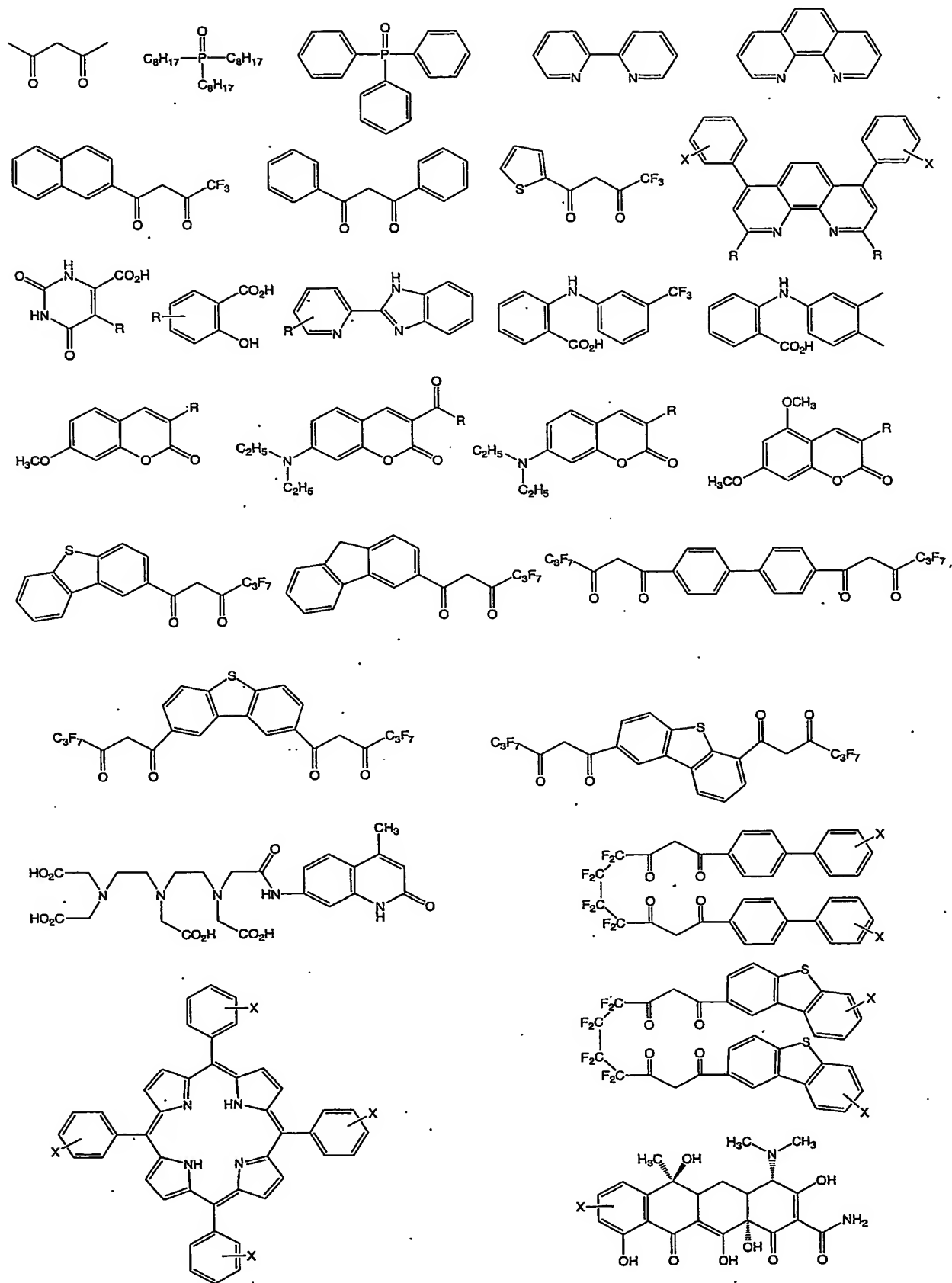


(式(1)～(6)中、 n は1～4の整数を示し、 R は置換基を有してもよいアリアル基を示し、 R' は水素原子、アミノ基、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基、又はイソチオシアネート基を示す。)

で示される配位子や、次に挙げられる



構造を有する配位子などと希土類元素からなる希土類蛍光錯体などが挙げられる。
また、次式



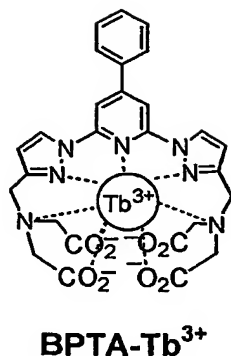
で表される化合物群から選ばれる少なくとも 1 種の化合物を配位子とすることもできる。

本発明は、前記してきた化合物群から選ばれる少なくとも 1 種の化合物を、本発明の希土類蛍光錯体の配位子として使用することを特徴のひとつとするものでもある。

本発明の希土類蛍光錯体における希土類金属としては、テルビウム又はユウロピウム、より詳細にはテルビウムイオン又はユウロピウムイオンが挙げられる。

式(2)、及び式(4)～式(6)におけるアリール基としては、1 個又は 2 個以上の単環、多環、又は縮合環式の 5 又は 6 員の芳香環からなる基であり、当該芳香環は 1 個以上の窒素原子、酸素原子、又は硫黄原子からなる異種原子を環中に有することもできる基である。好ましいアリール基としては、例えば、フェニル基、ナフチル基、ビフェニル基、ピリジル基、イミダゾリル基などが挙げられる。これらのアリール基の置換基としては、炭素数 1～8、好ましくは炭素数 1～5 程度の分枝状又は直鎖状の低級アルキル基、炭素数 1～8、好ましくは炭素数 1～5 程度の分枝状又は直鎖状の低級アルコキシ基、塩素、フッ素、臭素などのハロゲン、水酸基、アミノ基、カルボキシル基、スルホン酸基などが挙げられる。また、式(3)における R' 基は、ピリジン環の置換基であり、置換基を有する場合には、アミノ基、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基、イソチオシアネート基などの置換基を有することもできる。

さらに、具体的には、例えば、希土類蛍光錯体として、テルビウムイオンと有機配位子 N, N, N¹, N¹-[2, 6-ビス(3'-アミノメチル-1'-ピラゾリル)-4-フェニルピリジン] テトラキス酢酸 (N, N, N¹, N¹-[2,6-bis(3'-aminomethyl-1'-pyrazolyl)-4-phenylpyridine] tetrakis (acetic acid)) (前記一般式(2)の置換基 R がフェニル基のもの。以下、BPTA と略す。) とからなるテルビウム蛍光錯体蛍光 (以下、BPTA-Tb³⁺ と略す。) が挙げられ、BPTA、及びその N-ヒドロキシ琥珀酸イミドモノエステル (NH-S-BPTA と略す) の合成は、本発明者らの報告した方法 (J. Yuan, G. Wang, K. Majima, K. Matsumoto, Anal. Chem., 2001, 73, 1869) に準じて行うことができる。BPTA-Tb³⁺ の化学構造を次に示す。



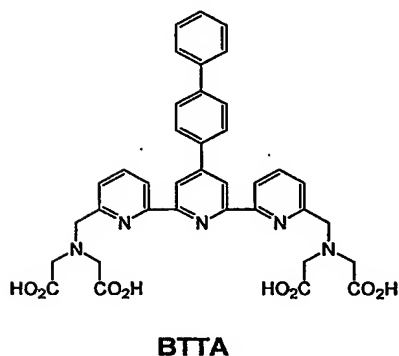
BPTA-Tb³⁺を含有する本発明のシリカ粒子の蛍光特性を、シリカ粒子の分散液の濃度が0.1mg/mlで励起波長が320nmで調べた結果を第1図に示す。第1図の横軸は波長(nm)を示し、縦軸は蛍光強度を示す。その結果、本発明のシリカ粒子は、導入したBPTA-Tb³⁺とほぼ同様の蛍光スペクトルを示すことがわかった。

次に、本発明のシリカ粒子の安定性について検討した。BPTA-Tb³⁺を含有する本発明のシリカ粒子を15mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)、15mMトリス-塩酸50mM塩化ナトリウム緩衝液(pH7.4)、1×SSC、1×PBS、1×TE、100mM炭酸緩衝液(pH9.0)などの各種のpHの緩衝液に分散し、1.0mg/lの分散液をそれぞれ調製し、これらの分散液の時間分解蛍光測定を行った。対照として同じ緩衝液におけるBPTA-Tb³⁺溶液を用いた。結果を第2図に示す。第2図縦軸は蛍光強度を示し、横軸の左側はBPTA-Tb³⁺溶液の場合を示し、右側は本発明のシリカ粒子の場合を示す。各6本の棒グラフは、左側から、(i)15mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)(黒塗り)、(ii)15mMトリス-塩酸50mM塩化ナトリウム緩衝液(pH7.4)(ドットで示される灰色部分)、(iii)1×SSC緩衝液(濃い灰色)、(iv)1×PBS緩衝液(右下斜線)、(v)1×TE緩衝液(pH8.0)(少し薄い灰色)、(vi)100mM炭酸緩衝液(pH9.0)(波線模様)をそれぞれ示す。測定条件は励起波長=320nm、測定波長=545nm、遅延時間(Delay time)=0.5m秒、ウィンドウ時間(Window time)=1.4m秒、サイクル時間(Cycling time)=2.

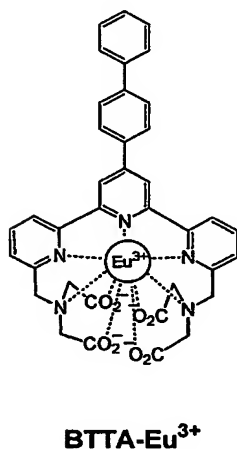
0 m秒であった。

この結果、BPTA- Tb^{3+} 溶液（第2図に左側）では、特に1×PBS、1×TE、100mM炭酸緩衝液（pH9.0）中で蛍光強度の急激な減少が観測されたが、本発明のシリカ粒子の蛍光はほぼ一定の値を示し、希土類蛍光錯体が粒子内部に存在し、緩衝液等の外部環境の影響から完全に保護されていることが示された。

また、ユウロピウムイオンと次式、



で表される前記式（2）のR基がビフェニル基である、2, 2', 2'', 2''' - [4' - ビフェニル - 2, 2' : 6', 2'' - ターピリジン - 6, 6'' - ジイル] ビス（メチレンニトリロ）四酢酸（以下、BTTAと略す。）を有機配位子とする次式、



で表される蛍光錯体蛍光（以下、 BT TA-Eu^{3+} と略す。）が挙げられる。

BT TA-Eu^{3+} を含有する本発明のシリカ粒子の蛍光特性を、シリカ粒子の分散液の濃度が 0.1 mg/ml で励起波長が 340 nm で調べた結果を第3図に示す。第3図の横軸は波長（ nm ）を示し、縦軸は蛍光強度を示す。その結果、本発明のシリカ粒子は、導入した BT TA-Eu^{3+} とほぼ同様の蛍光スペクトルを示すことがわかった。

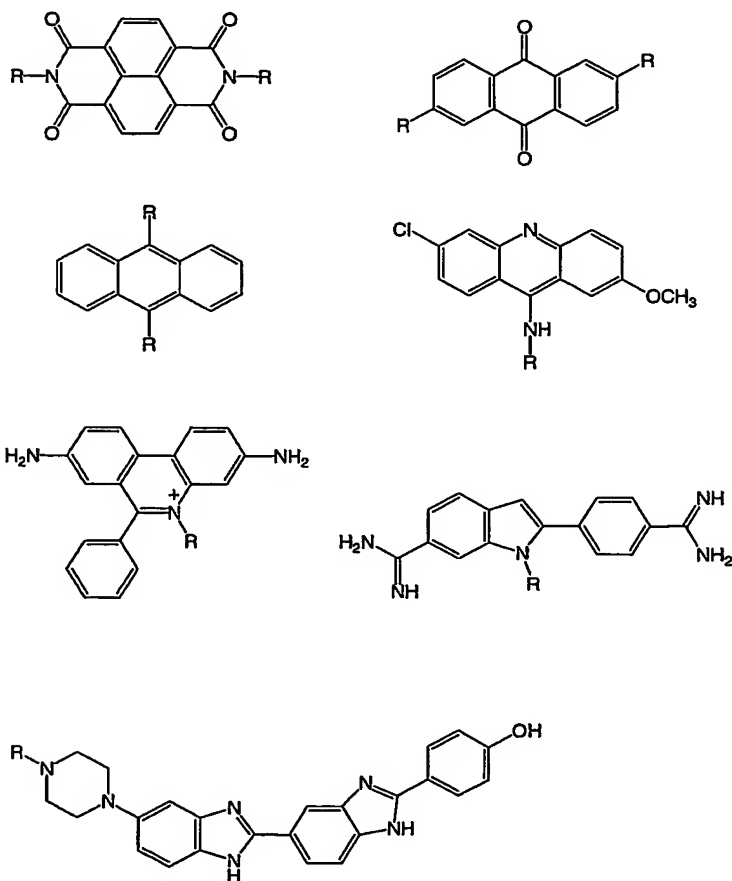
本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子の表面は、実質的にシリカからなり、内部の希土類蛍光錯体を外部環境から保護すると同時に、シリカ粒子の表面には各種の化合物と結合可能な官能基を有していることを特徴とするものである。このような官能基を使用して標識される物質（被標識物）を直接結合させることも可能であるが、シリカ粒子の表面の官能基に標識される物質との結合基を導入して結合させることもできる。このような結合基としては、シアノ基、アルキルアミノ基、アルカンチオール基、アルキルカルボキシル基、アルキルアルデヒド基などの各種の官能基が挙げられる。これらのアルキル基を有する官能基類は、シリカ粒子の表面のケイ素原子とアルキル基を介して、 Si-アルキルアミン や、 Si-アルカンチオール のような構造でシリカ粒子の表面に結合している。

本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子の表面に、前記したような結合基を介して、又は直接各種の分子を結合させることができる。このような分子種としては、抗体、抗原、受容体、核酸プローブなどの特異的結合が可能な分子種が挙げられる。例えば、核酸プローブとして、 $10 \sim 50$ 塩基、 $10 \sim 30$ 塩基、又は $10 \sim 25$ 塩基程度の長さのDNA又はRNA分子を本発明のシリカ粒子の表面に結合させておき、被検出核酸とハイブリダイズさせることにより、ハイブリダイズした核酸プローブを蛍光標識により検出ことができる。したがって、本発明は、本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子の表面にDNAやRNAなどの核酸プローブが結合してなる蛍光標識化核酸プローブを提供するものである。

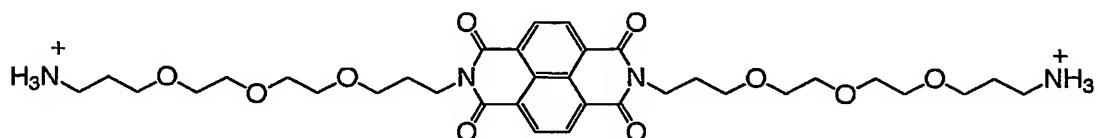
また、シリカ表面にインターカレーター分子を直接又は前記したような結合基を用いて導入することができる。このようなインターカレーター分子は、核酸類の二本鎖ハイブリッドに特異的にインターカレーションでき、二本鎖になったDNA/DNA、RNA/RNA、PNA/PNA、DNA/RNA、DNA/PNA、P

NA/RNAを特異的に標識することが可能になる。例えば、被検出DNAとプローブDNAをハイブリダイズさせ、本発明のシリカ粒子又はインターカレーターが導入されたシリカ粒子を添加することにより、ハイブリダイズが生じたか否かを容易に検出することが可能になる。したがって、本発明は本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子又はインターカレーターが導入されている希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を用いて、核酸類の二本鎖ハイブリッドを検出する方法を提供するものである。

このようなインターカレーター分子としては、以下のような分子を例示することができる。



前記式中の R 基は、シリカ粒子に結合するためのリンカー部分を示す。このようなリンカーとしては、ポリエーテル、ポリエチレンポリアミン類、アルキレン基などが挙げられる。より詳細には例えば、次式で示されるリンカーを有するインターカレーター分子が挙げられる。



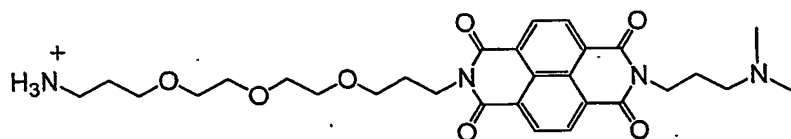
このインターカレーター分子を、結合基としてシアノ基を用いて、BPTA-Tb³⁺を含有する本発明のシリカ粒子の表面に固定化した。このシリカ粒子1mgを緩衝液に分散させ、これを2本鎖DNAが固定されているマイクロタイタープレートに加え、時間分解蛍光測定をした。対照として2本鎖DNAが固定化されていないマイクロタイタープレートをブランクとして用いた。結果を第4図に示す。第4図の左側2本は、2本鎖DNAが固定されているマイクロタイタープレートの場合を示し、右側の2本はブランクの場合を示す。第4図の縦軸は蛍光強度(a.u.)を示す。測定条件は励起波長=320nm、測定波長=545nm、遅延時間(Delay time)=0.5ms、ウィンドウ時間(Window time)=1.4ms、サイクル時間(Cycling time)=2.0msであった。

この結果、本発明のシリカ粒子にインターカレーター分子を結合させた蛍光標識によりハイブリダイズした２本鎖DNAを極めて明瞭に検出することができることがわかった。

このように、本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子は、当該希土類蛍光錯体含有シリカ粒子の表面に標識される物質（被標識物）を結合させるための結合基や、インターカレーター分子などを結合させることができ、したがって、本発明は、本発明のシリカ粒子の表面に前記した結合基やインターカレーター分子が導入されている希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を提供するものである。

さらに、粒子との反応部位を2箇所所有する二価性のインターカレーターと比べ、反応部位が1箇所のみの一価性のインターカレーター分子を用いることで、非特異的

吸着によるバックグラウンドノイズを減少させることが出来る。このようなインターカレーター分子としては次式で示されるインターカレーター分子が挙げられる。



本発明は、本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子をそのまま、又は前記した結合基を介して特異的結合をすることが可能な各種の分子種と結合させることができ、これらの分子種の蛍光標識剤として使用できる。したがって、本発明は、前記した本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子からなる蛍光標識剤を提供するものである。

本発明の蛍光標識剤は、通常の蛍光標識剤と同様に使用することができるが、表面が実質的にシリカであるシリカ粒子であるから、固定化用の担体としての機能も有するものであるが、粒子としての流動性も有するものである。

さらに、本発明の希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を含有してなる蛍光標識剤は、抗体、抗原、受容体、核酸プローブなどの特異的結合が可能な分子種と結合させて、マーカー、詳細には蛍光マーカーとして使用することができる。

そして、本発明の蛍光標識剤を含有してなる分子種又は当該蛍光標識剤を含有してなるマーカを用いて、標的分子を測定することができる。このような測定方法としては、通常の蛍光測定法や、希土類蛍光錯体の特性を生かした時間分解測定法などが挙げられる。また、本発明の蛍光標識剤を含有してなる分子種又は当該蛍光標識剤を含有してなるマーカを用いた標的分子の測定に必要となる、緩衝液や容器などの標的分子測定用の資材を合わせて標的分子測定用のキットとすることができる。したがって、本発明は、蛍光標識剤を含有してなる分子種又は当該蛍光標識剤を含有してなるマーカ、及び標的分子測定用の資材を含んでなる標的分子測定用キットを提供するものである。

なお、特願 2003-316006 明細書に記載された内容を、本明細書にすべて取り込む。

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

N, N, N' N' - { 2, 6 - ビス (3' - アミノメチル - 1' - ピラゾリル) - 4 - フェニルピリジン } 四酢酸 (B P T A と略す。) テルビウム錯体を含むシリカ粒子の合成

シクロヘキサン 7. 5 m l、n - ヘキサノール 1. 8 m l、界面活性剤 (T r i t o n X - 1 0 0) 3. 5 4 m l を混合し、これにイオン交換水 3 4 0 μ l を加え超音波照射しエマルジョンを形成させた。これにテトラエチルオルトシリケート 5 0 μ l を加え、I 液とした。B P T A 2. 0 m g、塩化テルビウム六水和物 1. 5 m g をイオン交換水 2 8 0 μ l、アンモニア水 6 0 μ l に溶解した。これをシクロヘキサン 7. 5 m l、n - ヘキサノール 1. 8 m l、界面活性剤 (T r i t o n X - 1 0 0) 3. 5 4 m l の混合溶液に加え超音波照射しエマルジョンを形成させ、I I 液とした。I 液に I I 液を攪拌しながら滴下し、その後さらに室温で 2 0 時間攪拌した。反応混合液にアセトンを加え、遠心分離により粒子を得た。この粒子をエタノール及び水でそれぞれ 3 回ずつ洗浄し、残留した界面活性剤及び表面に吸着した錯体を完全に除去した。減圧乾燥して白色の粒子 1 0 m g を得た。

実施例 2

2, 2', 2'', 2''' - [4' - ビフェニル - 2, 2' : 6', 2'' - ターピリジン - 6, 6'' - ジイル] ビス (メチレンニトリロ) 四酢酸 (B T T A と略す。) ユウロピウム錯体を含むシリカ粒子の合成

シクロヘキサン 7. 5 m l、n - ヘキサノール 1. 8 m l、界面活性剤 (B r i j - 9 7) 1. 3 4 g を混合し、これにイオン交換水 1. 3 6 m l を加え超音波照射しエマルジョンを形成させた。これにテトラエチルオルトシリケート 1 0 0 μ l

を加え、I液とした。BT TA 12 mg、塩化テルビウム六水和物 8.0 mgをイオン交換水 1.24 ml、2 M水酸化ナトリウム水溶液 120 μ lに溶解した。これをシクロヘキサン 7.5 ml、n-ヘキサノール 1.8 ml、界面活性剤 (Br i j - 97) 1.34 gの混合溶液に加え超音波照射しエマルションを形成させ、II液とした。I液を攪拌し、これにII液を滴下し、その後室温で20時間攪拌した。反応混合液にアセトンを加え、遠心分離により粒子を得た。この粒子をエタノール及び水でそれぞれ3回ずつ洗浄し、残留した界面活性剤及び表面に吸着した錯体を完全に除去した。減圧乾燥して白色の粒子 10 mgを得た。

実施例 3

実施例1で得られたシリカ粒子を15 mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、15 mMトリス-塩酸 50 mM塩化ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)、1 \times SSC緩衝液、1 \times PBS緩衝液、1 \times TE緩衝液 (pH 8.0)、100 mM炭酸緩衝液 (pH 9.0)に分散し、1.0 mg/lの分散液をそれぞれ調製した。これらの溶液をマイクロタイタープレートの各ウェルに100 μ lずつ加え、蛍光測定を行った。

対照実験として、BPTA-Tb³⁺を15 mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、15 mMトリス-塩酸 50 mM塩化ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)、1 \times SSC緩衝液、1 \times PBS緩衝液、1 \times TE緩衝液 (pH 8.0)、100 mM炭酸緩衝液 (pH 9.0)に10⁻⁸ Mとなるように調製し、これらの溶液をマイクロタイタープレートの各ウェルに100 μ lずつ加え、蛍光測定を行った。

本測定に用いた時間分解蛍光測定装置はARVO-SX 1420時間分解蛍光測定装置 (wallac 社製)であり、測定条件は励起波長=320 nm、測定波長=545 nm、遅延時間 (Delay time) = 0.5 m秒、ウインドウ時間 (Window time) = 1.4 m秒、サイクル時間 (Cycling time) = 2.0 m秒であった。

以上の、この測定で得られた蛍光強度を第2図に示した。第2図の左側は対照実験の結果を示し、右側は本発明のシリカ粒子の場合を示す。対照例においては、特に1 \times PBS緩衝液、1 \times TE緩衝液、100 mM炭酸緩衝液 (pH 9.1)中で蛍光強度の減少が観測された。一方でシリカ粒子の蛍光はほぼ一定の値を示し、希

土類蛍光錯体が粒子内部に存在し、緩衝液等の外部環境の影響から保護されていることが示された。

実施例 4 シリカ粒子の蛍光特性の評価

実施例 1 及び 2 で得られたシリカ粒子をイオン交換水に分散し、 0.1 mg/ml の分散液を調製した。この溶液を用いて蛍光スペクトルを、それぞれ第 1 図及び第 3 図に示した。得られたスペクトルは、導入した希土類蛍光錯体のスペクトルとほぼ同様であり、溶液中の特徴を保持したまま粒子中に取り込まれていることがわかった。

実施例 5 シリカ粒子表面へのシアノ基の導入

実施例 1 及び 2 で得られたシリカ粒子を 2 M 炭酸ナトリウム水溶液 9.0 ml に分散させ、これに臭化シアン 1.0 g のアセトニトリル溶液 0.5 ml を加え、室温で 10 分間攪拌した。遠心分離により粒子を分離した後、冷水及び PBS 緩衝液でそれぞれ 2 回ずつ洗浄し、白色の粒子を得た。

実施例 6 シリカ粒子表面へのインターカレーターの導入

実施例 5 で得られたシアノ化したシリカ粒子を PBS 緩衝液 1 ml に分散し、これに 10 M インターカレーター (N, N' -ビス (3- {2- [2- (3-アミノプロポキシ) エトキシ] エトキシ} プロピル) -1, 4, 5, 8-テトラカルボキシジイミドナフタレントリフルオロ酢酸塩) の PBS 溶液 10 ml を加え、室温で 15 時間放置した。その後、遠心分離により反応液を除去し、 0.1 M グリシン PBS 溶液 1.0 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。遠心分離により粒子を分離した後、 PBS 緩衝液で 2 回ずつ洗浄し、淡茶色の粒子を得た。

実施例 7 本発明に係るシリカ粒子を用いた DNA の標識

実施例 6 で得られたシリカ粒子を用いて 96 穴マイクロタイタープレート上に固定した DNA の標識実験を行った。具体的な操作法は次の通りである。

(i) DNA の固定化：二本鎖 DNA (salmon testes) を固定用緩衝液 (20 mM

トリス-塩酸緩衝液、150 mM 塩化マグネシウム、150 mM 塩化ナトリウム)に溶解し、1 mg/mlのDNA溶液を調製した。マイクロタイタープレート
の各ウェルにDNA溶液を100 μ lずつ加え、室温で一晩置いた。固定用緩衝液
で一回洗浄した後、固定を確実にするためにUV照射(254 nm、1600 mJ
/cm²)を行った。

(ii) マイクロタイタープレートのブロッキング：ブロッキング溶液(100 mM
トリス-塩酸緩衝液(pH 7.8)、100 mM 塩化ナトリウム、2%牛血清
アルブミン(BSA)、1%アジ化ナトリウム)をマイクロタイタープレートの各
ウェルに100 μ lずつ加え、遮光下室温で1時間置いた後、0.01×SSC緩
衝液で3回洗浄した。

(iii) DNAの標識：実施例4で得られたテルビウム錯体を含むシリカ粒子1
mgを1×SSC緩衝液600 μ lに分散させ、これをマイクロタイタープレート
の各ウェルに100 μ lずつ加え、遮光下室温で2時間置いた後、1×SSC緩衝
液で7回洗浄し、蛍光測定に用いた。

本測定に用いた時間分解蛍光測定装置はARVO-SX 1420時間分解蛍光
測定装置(wallac社製)であり、測定条件は励起波長=320 nm、測定波長=5
45 nm、遅延時間(Delay time)=0.5 ms、ウィンドウ時間(Window time)
=1.4 ms、サイクル時間(Cycling time)=2.0 msであった。

以上の測定で得られた蛍光強度とブランクとしてDNAが存在しない場合の蛍光
強度を第4図に示した。

実施例 8

実施例2で得られた粒子の形状を走査型電子顕微鏡で観察した。粒子の大きさは
ほぼ80 nmであった。得られた画像を第5図に示した。

実施例 9 シリカ粒子表面へのインターカレーターの導入(2)

実施例5で得られたシアノ化したシリカ粒子を0.1 M炭酸緩衝液5 mlに分散
し、これに200 mMインターカレーター(N-(3-{2-[2-(3-アミノ
プロポキシ)エトキシ]エトキシ}プロピル)-N'-(N,N-ジメチルアミノ

プロピル) - 1, 4, 5, 8 - テトラカルボキシジイミドナフタレントリフルオロ酢酸塩) の 0.1 M 炭酸緩衝液 250 ml を加え、室温で 15 時間放置した。その後、遠心分離により反応液を除去し、1 M グリシン PBS 溶液 1.0 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。遠心分離により粒子を分離した後、PBS 緩衝液で 2 回ずつ洗浄し、淡黄色の粒子を得た。

実施例 10 本発明に係るシリカ粒子を用いた DNA の標識 (1)

実施例 1 で得られたシリカ粒子を用いて 96 穴マイクロタイタープレート上に固定した DNA の標識を行った。具体的な操作法は次の通りである。

(i) DNA の固定化: 二本鎖 DNA (salmon testes) を固定用緩衝液 (20 mM トリス-塩酸緩衝液、150 mM 塩化マグネシウム、150 mM 塩化ナトリウム) に溶解し、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DNA 溶液を調製した。マイクロタイタープレートの各ウェルに DNA 溶液を 100 μl ずつ加え、室温で一晩置いた。固定用緩衝液で一回洗浄した後、固定を確実にするために UV 照射 (254 nm、1600 mJ/cm^2) を行った。一本鎖 DNA は、上述の二本鎖 DNA を固定用緩衝液に溶解したものを、95 度、10 分間加熱し、急冷することで熱変性を行った試料を用いて二本鎖 DNA と同様の操作で固定した。

(ii) マイクロタイタープレートのブロッキング: ブロッキング溶液 (100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8)、100 mM 塩化ナトリウム、2% 牛血清アルブミン (BSA)、1% アジ化ナトリウム) をマイクロタイタープレートの各ウェルに 100 μl ずつ加え、遮光下室温で 1 時間置いた後、0.01 \times SSC 緩衝液で 3 回洗浄した。

(iii) アルカリ変性: 一本鎖 DNA については、ブロッキングの操作の後、0.1 N NaOH、0.1 M NaCl 溶液を各ウェルに 100 ml ずつ加え、室温で 20 分間放置した後、4 度に冷却した 1 \times SSC 緩衝液で 3 回洗浄した。

(iv) DNA の標識: 実施例 6 で得られたテルビウム錯体を含むシリカ粒子 1 mg を 1 \times SSC 緩衝液 600 ml に分散させ、これをマイクロタイタープレートの各ウェルに 100 ml ずつ加え、遮光下室温で 5 分間置いた後、1 \times SSC 緩衝液で 7 回洗浄し、蛍光測定に用いた。

本測定に用いた時間分解蛍光測定装置は ARVO-SX 1420 時間分解蛍光測定装置 (wallac 社製) であり、測定条件は励起波長 = 320 nm、測定波長 = 445 nm、遅延時間 (Delay time) = 0.5 ms、ウィンドウ時間 (Window time)

= 1.4 ms、サイクル時間 (Cycling time) = 2.0 ms であった。

以上の測定で得られた蛍光強度を第6図に示した。

実施例 11 本発明に係るシリカ粒子を用いたDNAの標識 (2)

実施例6で得られたシリカ粒子を用いて96穴マイクロタイタープレート上に固定したDNAの標識を行った。具体的な操作法は実施例10と同様である。測定で得られた蛍光強度とブランクとしてDNAが存在しない場合の蛍光強度を第7図に示した。

実施例 12 本発明に係るシリカ粒子を用いたDNAの標識 (3)

実施例9で得られたシリカ粒子を用いて96穴マイクロタイタープレート上に固定したDNAの標識を行った。具体的な操作法は次の通りである。

(i) DNAの固定化: 二本鎖DNA (M13mp18 RF DNA、タカラバイオ株式会社) 又は一本鎖DNA (M13mp18 Single Strand DNA、タカラバイオ株式会社) を固定用緩衝液 (20 mM トリス-塩酸緩衝液、150 mM 塩化マグネシウム、150 mM 塩化ナトリウム) に溶解し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のDNA溶液を調製した。マイクロタイタープレートの各ウェルにDNA溶液を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、37度で一晩置いた。固定用緩衝液で一回洗浄した後、固定を確実にするためにUV照射 (254 nm 、 $1600 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) を行った。

(ii) DNAの標識: 実施例9で得られたユウロピウム錯体を含むシリカ粒子 1 mg を $1 \times \text{SSC}$ 緩衝液 2.5 ml に加え、超音波照射を5分間行い分散させ、これをマイクロタイタープレートの各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、遮光下室温で10分間置いた後、 $1 \times \text{SSC}$ 緩衝液で9回、0.2% Triton X-100水溶液で9回洗浄し、蛍光測定に用いた。

本測定に用いた時間分解蛍光測定装置はARVO-SX 1420時間分解蛍光測定装置 (wallac 社製) であり、測定条件は励起波長 = 340 nm 、測定波長 = 615 nm 、遅延時間 (Delay time) = 0.1 ms 、ウィンドウ時間 (Window time) = 1.5 ms 、サイクル時間 (Cycling time) = 2.0 ms であった。

以上の測定で得られた蛍光強度とブランクとしてDNAが存在しない場合の蛍光

強度を第 8 図に示した。

産業上の利用可能性

本発明は、被標識物（例えば、生体由来物質、生理活性物質等）との結合基を表面に有し、内部に希土類蛍光錯体を含むシリカ粒子からなる標識試薬を提供するものである。該粒子内の錯体は外部の環境からの影響を受けず、被標識物との結合基はシリカ表面に導入できるため、これまで、結合基の導入の困難さ、結合基の導入による蛍光強度の極端な低下、キレート力の不足による希土類金属の解離などの要因により標識剤として使用できなかった希土類蛍光錯体をも標識剤として利用することが可能となる。さらに、粒子中に多くの蛍光錯体を含むため、錯体を直接標識する場合に比べ強い蛍光強度がえられる。

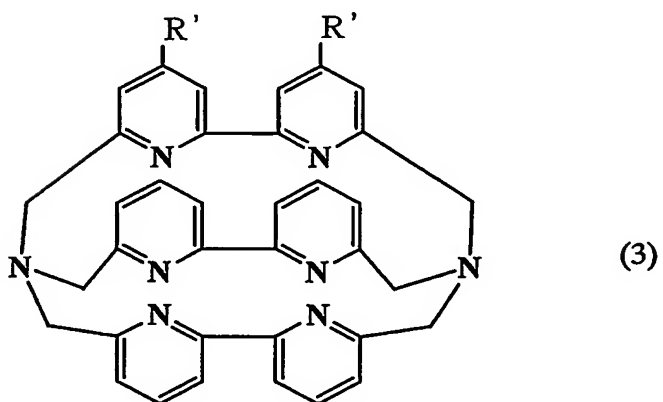
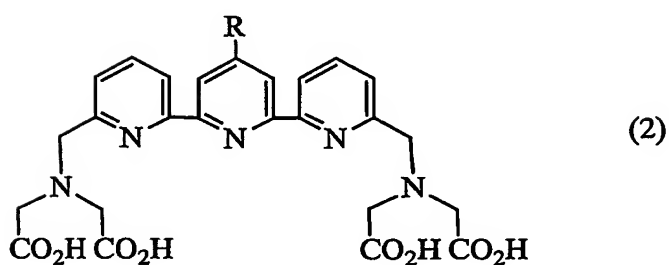
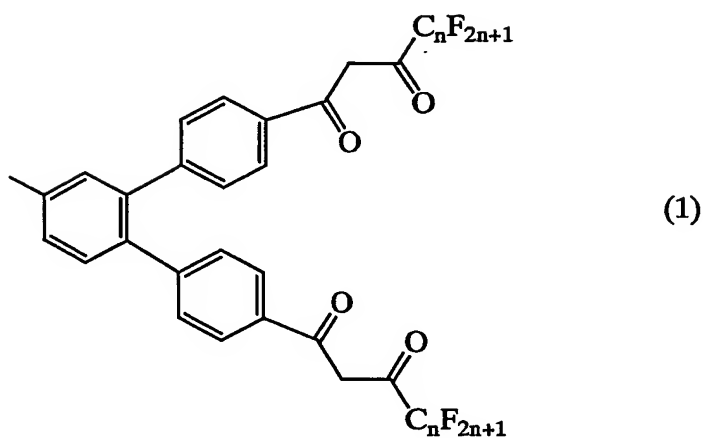
また、本発明に係るインターカレーターを導入した蛍光標識剤は、二本鎖 DNA を特異的に標識することができ DNA チップ等に直接応用可能である。

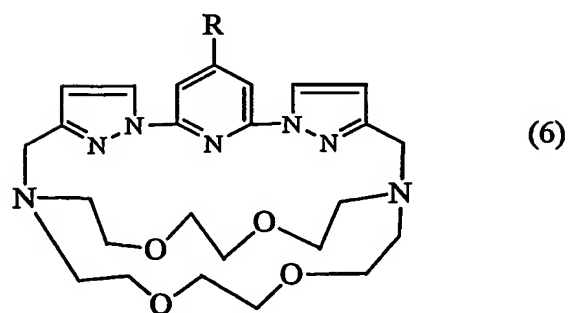
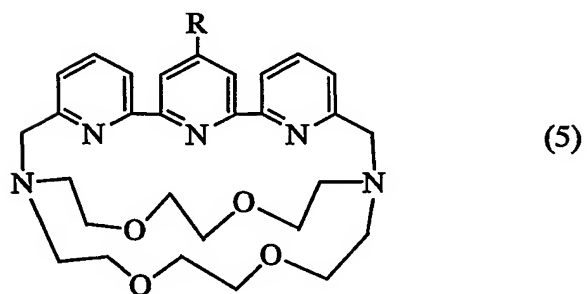
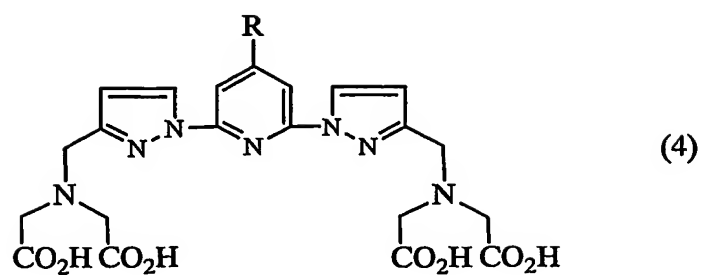
本発明は、蛍光標識をシリカ粒子の内部に閉じこめた蛍光標識用の蛍光物質含有シリカ粒子を提供するものである。本発明のシリカ粒子からなる蛍光標識剤は、各種の蛍光測定用の蛍光標識剤として使用することができるものであり、従来の蛍光標識剤と同様に使用できるだけでなく、シリカ粒子としての担体としての機能も有し、かつ蛍光物質がシリカ粒子の内部に閉じこめられているために、標識用の蛍光物質は外部の環境に左右されず安定に存在することができる。

したがって、本発明のシリカ粒子、及びそれを用いた蛍光標識剤、それを用いた測定方法等は、各種の蛍光測定用標識剤として有用であり産業上の利用性を有するものである。

請 求 の 範 囲

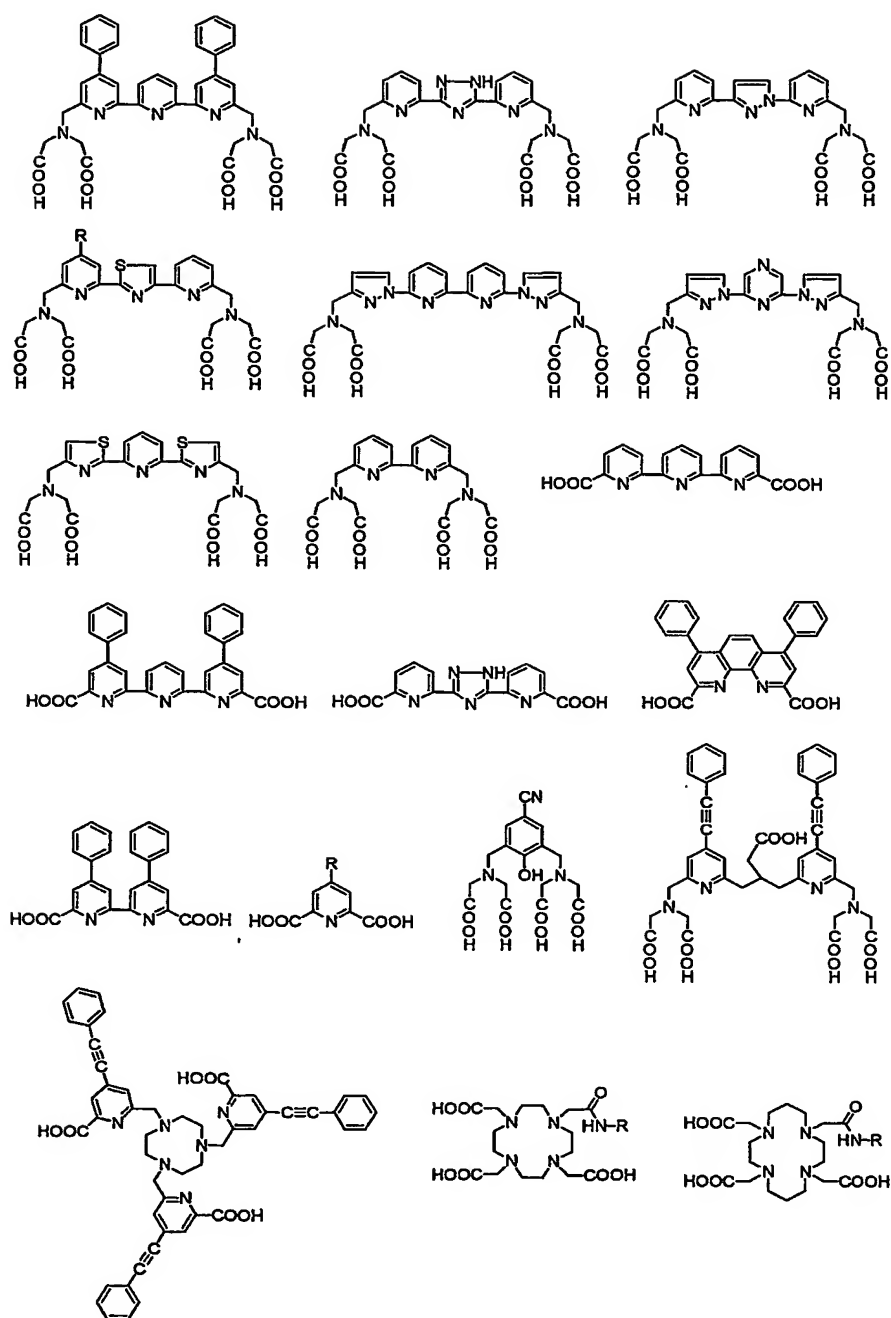
1. 希土類蛍光錯体含有してなる希土類蛍光錯体含有シリカ粒子。
2. 希土類蛍光錯体が、次式（１）～（６）





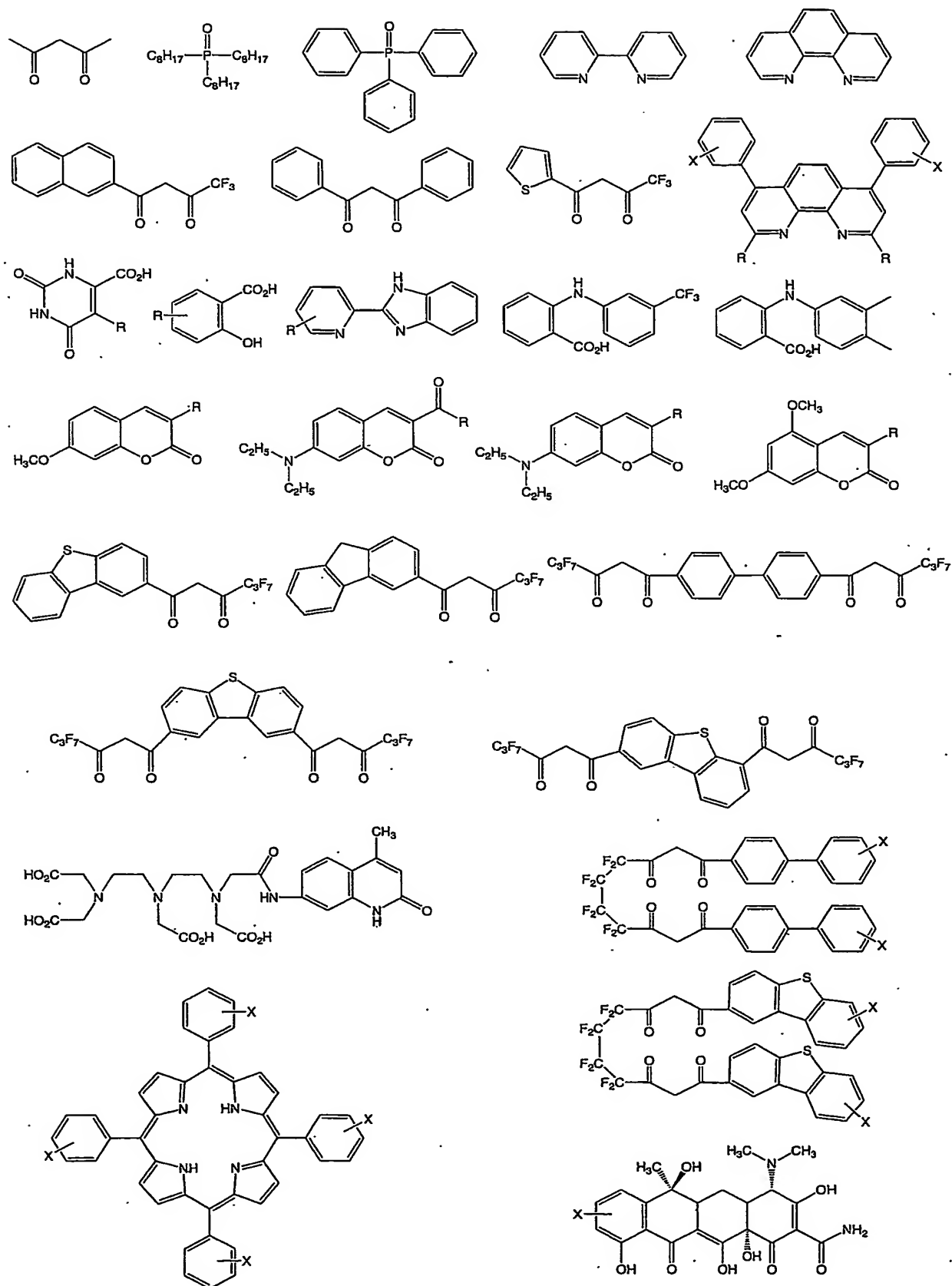
で表される化合物の少なくとも 1 種を配位子として含有するものである請求の範囲
第 1 項に記載のシリカ粒子。

3. 希土類蛍光錯体が、次式



で表される化合物群から選ばれる少なくとも1種の化合物を配位子として含有するものである請求の範囲第1項に記載のシリカ粒子。

4. 希土類蛍光錯体が、次式



で表される化合物群から選ばれる少なくとも１種の化合物を配位子として含有するものである請求の範囲第１項に記載のシリカ粒子。

５．希土類蛍光錯体が、テルビウム又はユウロピウムの錯体である請求の範囲第１項～第４項のいずれかに記載のシリカ粒子。

６．希土類蛍光錯体含有シリカ粒子が、エマルジョン重合合法により製造されたものである請求の範囲第１項～第５項のいずれかに記載のシリカ粒子。

７．希土類蛍光錯体が、主としてシリカ粒子の内部層に選択的に含有されている請求の範囲第１項～第６項のいずれかに記載のシリカ粒子。

８．希土類蛍光錯体含有シリカ粒子に標識される物質との結合基が導入されている請求の範囲第１項～第７項のいずれかに記載のシリカ粒子。

９．結合基が、シアノ基である請求の範囲第８項に記載のシリカ粒子。

１０．希土類蛍光錯体含有シリカ粒子に二本鎖DNAと特異的に結合するインターカレーターが導入されている請求の範囲第１項～第９項のいずれかに記載のシリカ粒子。

１１．希土類蛍光錯体含有シリカ粒子に二本鎖RNAと特異的に結合するインターカレーターが導入されている請求の範囲第１項～第９項のいずれかに記載のシリカ粒子。

１２．希土類蛍光錯体含有シリカ粒子に二本鎖PNAと特異的に結合するインターカレーターが導入されている請求の範囲第１項～第９項のいずれかに記載のシリカ粒子。

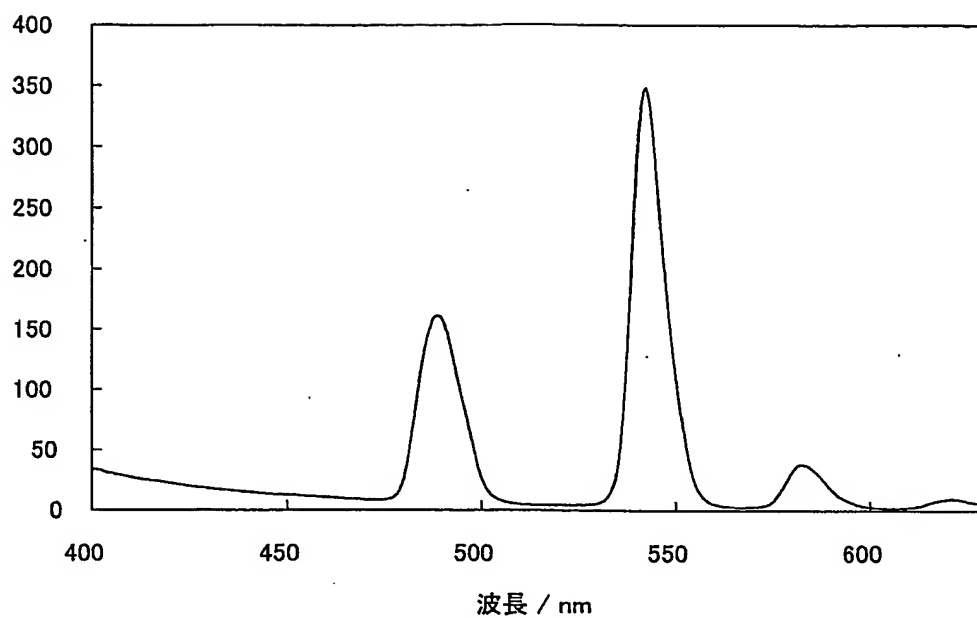
１３．希土類蛍光錯体含有シリカ粒子にDNA/RNAの二本鎖ハイブリッドと特異的に結合するインターカレーターが導入されている請求の範囲第１項～第９項のいずれかに記載のシリカ粒子。

１４．希土類蛍光錯体含有シリカ粒子にDNA/PNAの二本鎖ハイブリッドと特異的に結合するインターカレーターが導入されている請求の範囲第１項～第９項のいずれかに記載のシリカ粒子。

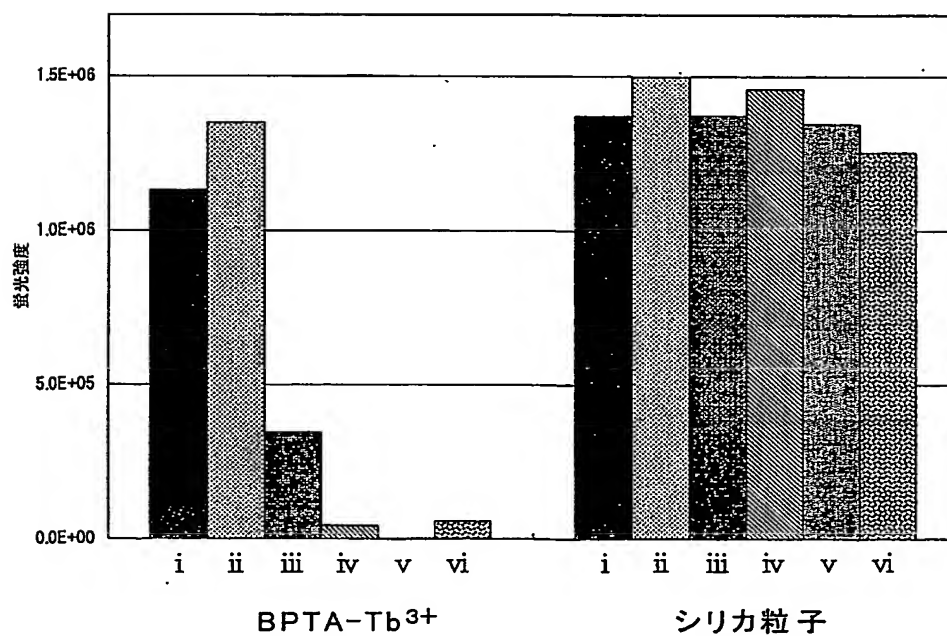
１５．希土類蛍光錯体含有シリカ粒子にRNA/PNAの二本鎖ハイブリッドと特異的に結合するインターカレーターが導入されている請求の範囲第１項～第９項のいずれかに記載のシリカ粒子。

16. インターカレーターが一価性インターカレーターである請求の範囲第10項～第15項のいずれかに記載のシリカ粒子。
17. 請求の範囲第1項～第16項のいずれかに記載のシリカ粒子からなる蛍光標識剤。
18. 請求の範囲第1項～第16項のいずれかに記載のシリカ粒子の表面に核酸プローブが結合してなる蛍光標識化核酸プローブ。
19. 核酸がDNAである請求の範囲第18項に記載の核酸プローブ。
20. 核酸がRNAである請求の範囲第18項に記載の核酸プローブ。
21. 核酸がPNAである請求の範囲第18項に記載の核酸プローブ。
22. 請求の範囲第10項に記載の二本鎖DNAと特異的に結合するインターカレーターが導入されている希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を用いて、二本鎖DNAを検出する方法。
23. 請求の範囲第11項に記載の二本鎖RNAと特異的に結合するインターカレーターが導入されている希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を用いて、二本鎖RNAを検出する方法。
24. 請求の範囲第12項に記載の二本鎖PNAと特異的に結合するインターカレーターが導入されている希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を用いて、二本鎖PNAを検出する方法。
25. 請求の範囲第13項に記載のDNA/RNAの二本鎖ハイブリッドと特異的に結合するインターカレーターが導入されている希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を用いて、DNA/RNAの二本鎖ハイブリッドを検出する方法。
26. 請求の範囲第14項に記載のDNA/PNAの二本鎖ハイブリッドと特異的に結合するインターカレーターが導入されている希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を用いて、DNA/PNAの二本鎖ハイブリッドを検出する方法。
27. 請求の範囲第15項に記載のRNA/PNAの二本鎖ハイブリッドと特異的に結合するインターカレーターが導入されている希土類蛍光錯体含有シリカ粒子を用いて、RNA/PNAの二本鎖ハイブリッドを検出する方法。
28. 請求の範囲第17項に記載の蛍光標識剤を含有してなる分子種又は当該蛍光標識剤を含有してなるマーカー、及び標的分子測定用の資材を含んでなる標的分子測定用キット。

第 1 図

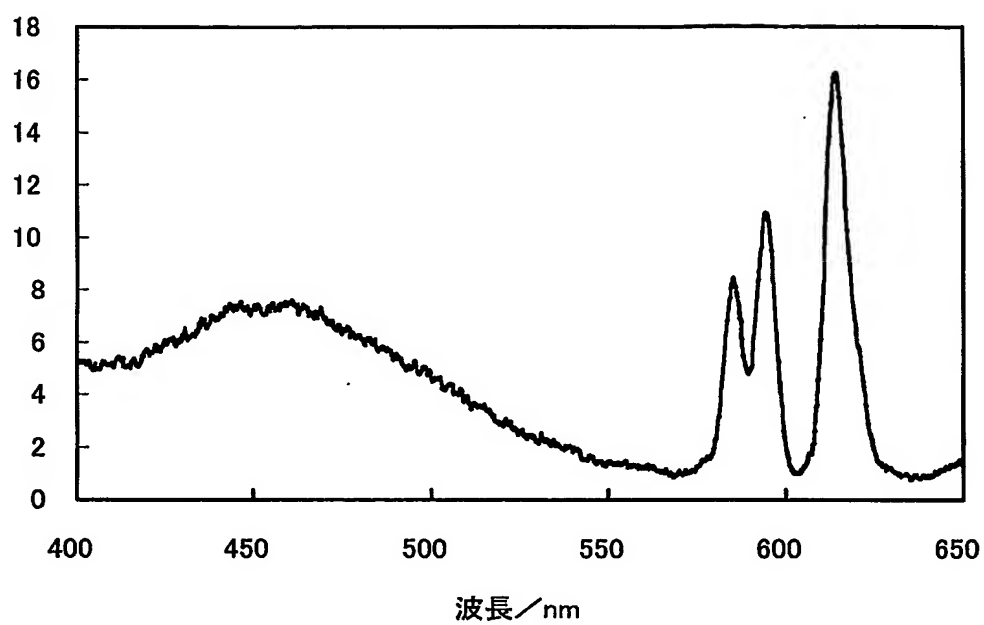


第 2 図

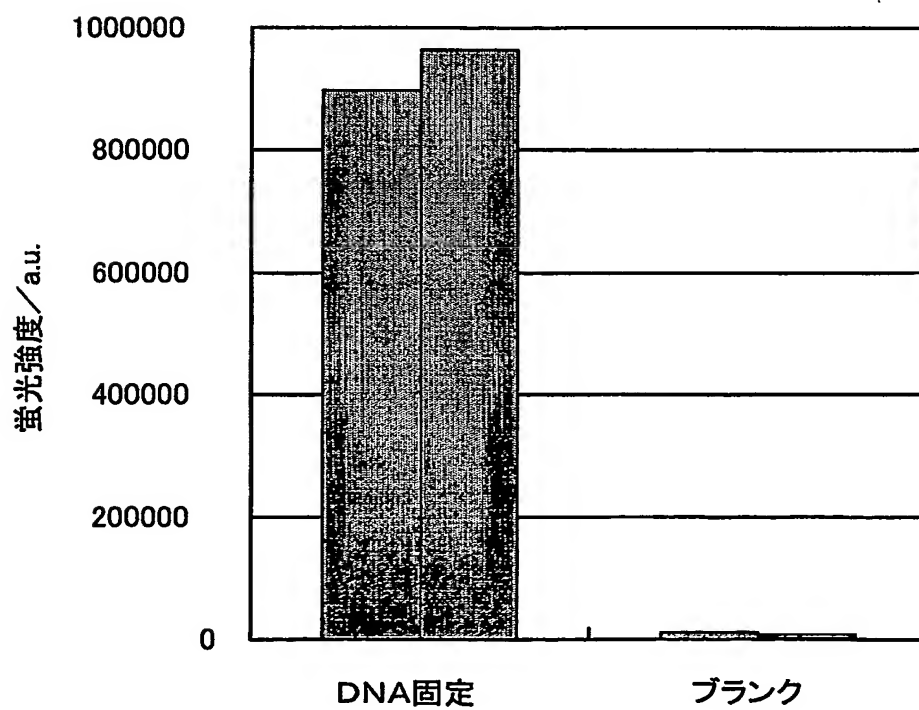


BEST AVAILABLE COPY

第 3 図

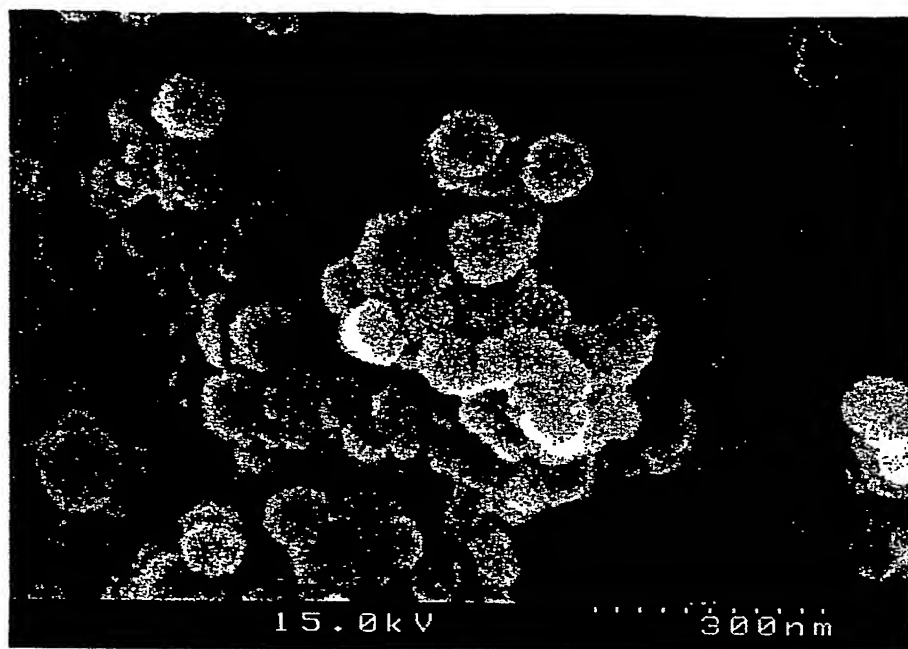


第 4 図

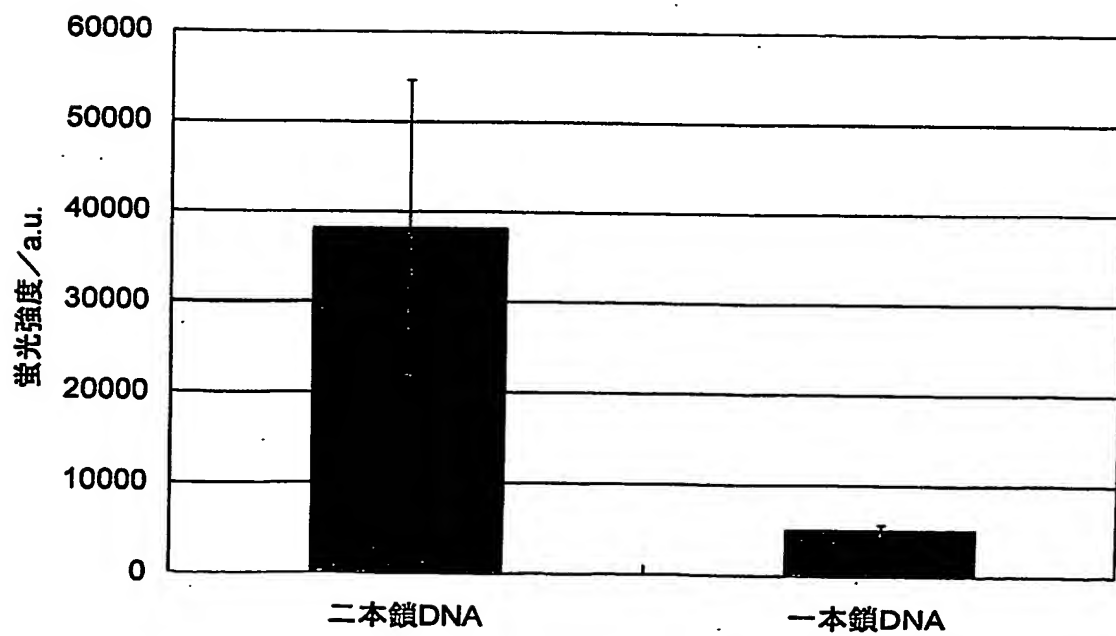


BEST AVAILABLE COPY

第 5 図

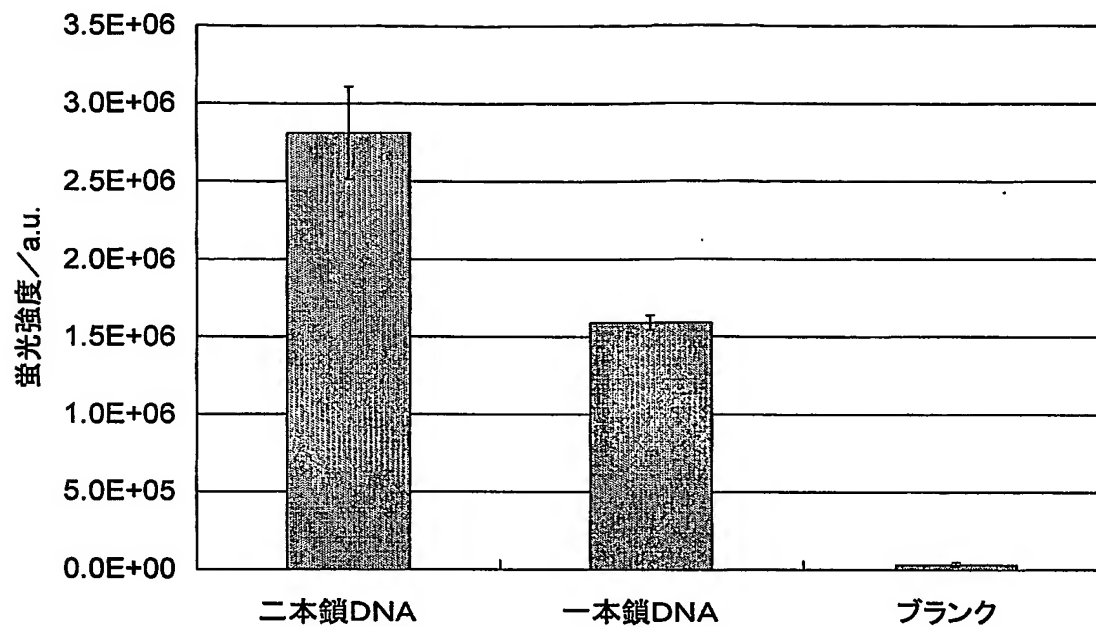


第 6 図

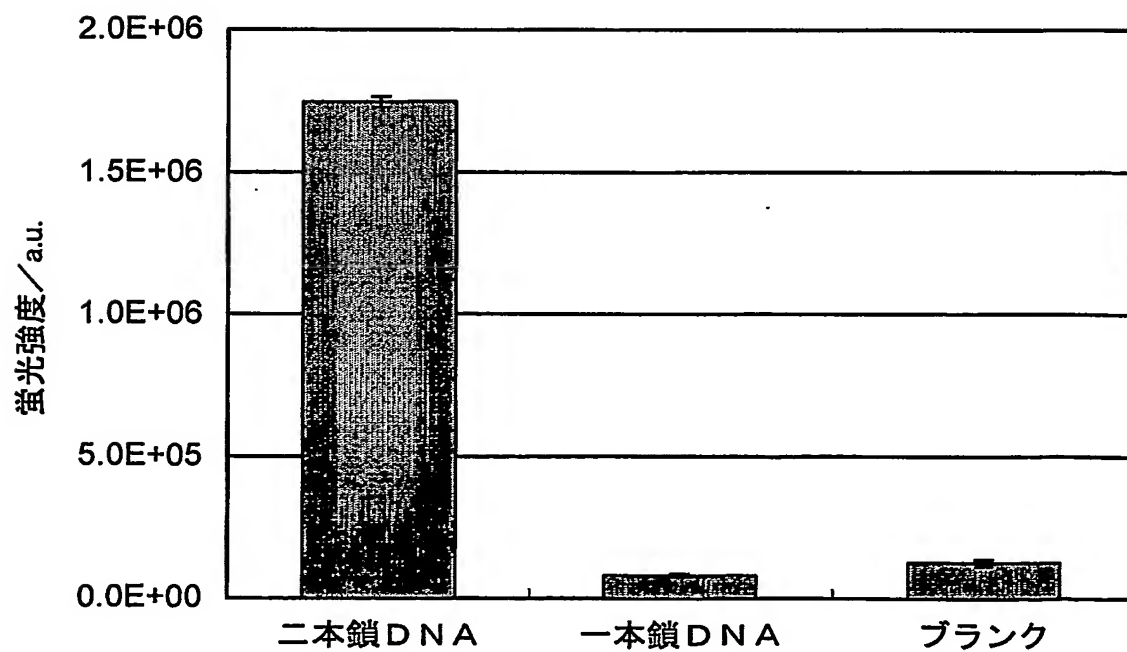


BEST AVAILABLE COPY

第 7 図



第 8 図



BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C09K11/06, C01B33/12, G01N33/543, G01N33/533, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C09K11/06, C01B33/12, G01N33/543, G01N33/533, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2002-214237 A (Dade Behring Marburg GmbH.), 31 July, 2002 (31.07.02), Claims; Par. Nos. [0040], [0034] to [0036] & CA 2365565 A1 & EP 1219964 A1 & DE 10064827 A	1-5, 7, 8, 10-28 9
Y	JP 2003-194824 A (Toyobo Co., Ltd.), 09 July, 2003 (09.07.03), Claims (Family: none)	1-5, 7, 8, 10-28
X	JP 2000-321279 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 24 November, 2000 (24.11.00), Claims; Par. Nos. [0006], [0007], [0021] (Family: none)	1, 4, 5, 7, 8, 10-28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 November, 2004 (29.11.04)Date of mailing of the international search report
21 December, 2004 (21.12.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013392

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-181816 A (Waseda University), 26 June, 2002 (26.06.02), Claims & EP 1221466 A1 & CA 2364324 A1 & US 2002/0150929 A1	1,4,5,7
Y	JP 2000-345037 A (President of Osaka University), 12 December, 2000 (12.12.00), Claims; page 4, right column, lines 34 to 36 (Family: none)	1,4,5,7
X	JP 4-72564 A (Mitsubishi Kasei Corp.), 06 March, 1992 (06.03.92),	1,5,7,8, 10-28
Y	Claim 1; page 3, lower left column, lines 11 to 18, lower right column, lines 3 to 5 (Family: none)	2-4
X	WO 01/088540 A1 (University of Florida), 22 November, 2001 (22.11.01),	1,5-8,10-28
Y	& CA 2410023 A1 & US 2002/0098529 A1 & EP 1287359 A1 & JP 2003-533363 A	2-4
A	JP 2003-155478 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 30 May, 2003 (30.05.03), Claims; Par. No. [0015] (Family: none)	1-28

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C09K11/06, C01B33/12, G01N33/543, G01N33/533, G01N33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C09K11/06, C01B33/12, G01N33/543, G01N33/533, G01N33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P 2002-214237 A (デイト・ベ・リング・マルブルク・ゲゼル シャフト・ミット・ベ・シュレンクテル・ハフツング) 2002.07.31、特許請求の範囲、【0	1-5, 7, 8, 10-2
A	040】【0034】～【0036】&CA 2365565 A1 &EP1219964 A1 &DE 10064827 A	8 9
Y	J P 2003-194824 A (東洋紡績株式会社) 2003.07. 09、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-5, 7, 8, 10- 28
X	J P 2000-321279 A (三菱化学株式会社) 2000.11. 24、特許請求の範囲、【0006】【0007】【0021】(ファミリーなし)	1, 4, 5, 7, 8, 10 -28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.11.2004

国際調査報告の発送日

21.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡辺 陽子

4 V

9 2 7 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3483

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P 2002-181816 A (学校法人早稲田大学) 2002.06.26, 特許請求の範囲 &EP 1221466 A3 &CA 2364324 A1 & US 2002/0150929 A1	1, 4, 5, 7
Y	J P 2000-345037 A (大阪大学長) 2000.12.12, 特許請求の範囲、第4頁右欄34～36行(ファミリーなし)	1, 4, 5, 7
X Y	J P 4-72564 A (三菱化成株式会社) 1992.03.06, 請求項1、第3頁左下欄11～18行、第3頁右下欄3～5行(ファミリーなし)	1, 5, 7, 8, 10-28 2-4
X Y	WO 01/088540 A1 (ユニヴァーシティ オブ フロリダ) 2001.11.22 & CA 2410023 A1 & US 2002/0098529 A1 & EP 1287359 A1 & JP 2003-533363 A	1, 5-8, 10-28 2-4
A	J P 2003-155478 A (三菱化学株式会社) 2003.05.30, 特許請求の範囲、【0015】 (ファミリーなし)	1-28

BEST AVAILABLE COPY